

KARAKTERISTIK SENYAWA BIOAKTIF BAKTERI SIMBION MOLUSKA DENGAN GC-MS

CHARACTERISTIC BIOACTIVE COMPOUND OF THE MOLLUSC SYMBIOTIC BACTERIA BY USING GC-MC

Delianis Pringgenies

Marine Science Departement, Faculty of Fisheries and Marine Science
Diponegoro Univeristy, Semarang, e-mail: pringgenies@yahoo.com

ABSTRACT

*It has been discovered that mollusca produce a secondary metabolite and in the same time bear its important role in its ecosystems so became a strategic target for the development of noble bioactive substances for marine pharmacology. The current study of molluscs symbiotic bacteria showed that from species of *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* and from based on screening of symbiotic bacteria in the Mollusc toward some bacteria, 3 isolates had been had good performance in inhibiting the grow of bacteria and to be the best candidates for a new antibiotic based on result of screening consistency. Size and character inhibiting zone resulted toward test bacteria were TCM, TCA and TOV. The research aims to current study of characteritic of symbiotic bacteria from molluscs that produce a new anti-pathogenic bacteria by using GC-MS method. GC-MS result showed that fraction TCM-6.1 consist of some compounds, that are Nitrogen oxide (N₂O) (CAS) Nitrous oxide; Acetic acid (CAS) Ethylic acid; Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid and fraction TOV12.16 consist of compound such as Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid; Butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-Methylbutanoid acid then fraction TSA8.7 consist of 1,2-Propadiene (CAS) Allene. The research pointed towards the three active symbiotic bacteria seems to be promising since this three candidates potential result for the development of a new antibiotic.*

Keywords: *Bacteria simbiot, mollusc, anti-bacteria, bioaktif compound*

ABSTRAK

Keberadaan bakteri yang berasosiasi dengan moluska laut telah memungkinkan penggunaan organisme tersebut sebagai sumber utama bakteri yang baru dan sumber senyawa bioaktif termasuk senyawa antimikroba. Hasil penelitian sebelumnya dari isolasi bakteri simbiot jenis *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* dan berdasarkan konsistensi hasil skrining, besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan dan sifat penghambatannya terhadap beberapa jenis bakteri uji melalui uji sensitivitas maka dihasilkan 3 isolat bakteri simbiot yang memiliki senyawa bioaktif antibakteri yakni: TCM, TCA dan TOV. Tujuan penelitian adalah mengetahui karakteristik senyawa bioaktif bakteri yang berasosiasi dengan Moluska jenis *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* dengan metode GC-MS. Analisis GC-MS dilakukan menggunakan GCMS-QP2010S Shimadzu. Hasil analisis GC-MS menunjukkan bahwa terdapat beberapa senyawa yang terdeteksi dari fraksi isolat TCM6.1, yakni: Nitrogen oxide (N₂O) (CAS) Nitrous oxide; Acetic acid (CAS) Ethylic acid; Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid dan fraksi isolat TOV12.16 : Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid; Butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-Methylbutanoid acid sedang fraksi isolat TSA8.7: 1,2-Propadiene (CAS) Allene. Hasil penelitian disimpulkan bahwa isolat bakteri aktif yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan.

Kata Kunci: Bakteri simbiot, moluska, anti-bakteri, senyawa bioaktif

I. PENDAHULUAN

Lautan merupakan sumber dari kelompok besar kimia bahan hayati laut dengan struktur yang unik, yang terutama terakumulasi pada hewan-hewan avertebrata yang banyak terdapat pada ekosistem terumbu karang, seperti, sponge, tunikata, bryozoa, karang lunak dan moluska. Beberapa metabolit sekunder yang dimiliki avertebrata laut tersebut menunjukkan adanya aktifitas farmakologi dan merupakan kandidat-kandidat baru untuk bahan obat-obatan. Sejumlah senyawa bioaktif yang diperoleh dari hewan avertebrata diduga dihasilkan juga oleh mikroorganisme yang berasosiasi dengannya. Seperti dinyatakan oleh Watermann, 1999; Burgess *et al.* (2003) bahwa mikroorganisme yang berasosiasi dengan organisme laut akan mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya.

Keberadaan bakteri yang berasosiasi dengan moluska laut telah memungkinkan penggunaan organisme tersebut sebagai sumber utama bakteri yang baru. Bukti-bukti ilmiah menunjukkan bahwa bakteri yang berasosiasi dengan avertebrata filum Moluska jenis *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* mempunyai peranan dalam produksi senyawa bioaktif, sehingga menjadi pemacu dalam pencarian senyawa antimikroba dari bakteri yang berasosiasi dengan Moluska (Pringgenies *et al.*, 2008). Penanganan bakteri patogen di dalam bidang kesehatan serta pemanfaatan senyawa antibiotik yang ramah lingkungan yang dihasilkan oleh bakteri yang berasosiasi dengan Moluska telah menjadi pekerjaan rumah yang harus segera ditangani secara multidisiplin (Hunt and Vincent, 2006).

Secara geografis perairan Ternate merupakan pertemuan lempeng antara benua Australia dan Indonesia dan biota di tempat tersebut memiliki potensi yang

sangat spesifik terutama sebagai bahan farmasi bahari, maka sampel bakteri yang berasosiasi dengan Moluska dikoleksi dari perairan Ternate.

Tujuan penelitian adalah mengetahui karakteristik senyawa bioaktif bakteri yang berasosiasi dengan Moluska jenis *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* dengan metode GC-MS.

II. METODE PENELITIAN

Sampling Moluska jenis *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* dikoleksi dari perairan pulau Bastiong Kepulauan Ternate, Maluku. Selanjutnya dilakukan isolasi bakteri, skrining bakteri penghasil senyawa anti-MDR, uji antibakteri moluska, isolasi bakteri patogen klinik (MDR) jenis *Klebsiella*, *E. coli*, Coagulase Negatif *Staphylococcus* (CNS), *Enterobacter* 5, *Enterobacter* 10 dan *Pseudomonas*, uji sensitifitas antibakteri, uji kepekaan terhadap kuman antimikroba. Hasil seleksi dari 12 isolat bakteri moluska jenis *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* yang sudah dilakukan sebelumnya memperlihatkan bahwa ada 3 isolat yang dianggap paling berpotensi untuk dijadikan sebagai sumber antibiotik baru berdasarkan konsistensi hasil skrining, besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan dan sifat penghambatannya terhadap beberapa jenis bakteri uji yakni isolat bakteri TCM, TCA dan TOV digunakan untuk studi selanjutnya. Selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dengan metode PCR, Sekuensing DNA. Hasil sekuen 16S rDNA selanjutnya dianalisis dan diedit dengan menggunakan program GENETYX dan Analisis sekuen 16S rDNA.

Amplifikasi DNA dari ke 3 isolat bakteri moluska yakni: TCM, TCA dan TOV yang sudah dilakukan sebelumnya

menunjukkan bahwa semua isolat menghasilkan *single band* (pita tunggal) dengan ukuran sekitar 1500 bp sesuai dengan perbandingan menggunakan marker DNA. Analisis homologi menggunakan *BLAST searching* menunjukkan bahwa isolate TOV12.16 memiliki prosentase kesamaan tertinggi dengan genus *Vibrio alginolyticus* strain VM341 (96%). Sedangkan isolat TCM memiliki prosentase kesamaan tertinggi dengan genus *Pseudoalteromonas* sp. (99%), dan isolate TCA memiliki tertinggi dengan *Vibrio* sp. AC1 (99 %). Hasil identifikasi bakteri diketahui bahwa isolat TCM memiliki kekerabatan terdekat dengan *Pseudoalteromonas* sedangkan isolat TCA dan TOV memiliki kekerabatan yang dekat isolat yang sama-sama berada dalam genus *Vibrio*. Hasil penelitian ini dilanjutkan untuk mengetahui karakteristik senyawa bioaktif Moluska sampel isolat TCM, TCA dan TOV dengan analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS).

2.1. Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS)

Analisis GC-MS dilakukan menggunakan GCMS-QP2010S Shimadzu dengan kondisi analisis sebagai berikut : kolom Rtx-5MS 30 meter, diameter 0,25 mm, suhu terprogram dari 80 °C sampai 300 °C dengan kenaikan suhu 10 °C/menit, dan gas pembawa Helium, sedangkan untuk tekanannya sebesar 22 kPa. Jumlah senyawa yang terdapat dalam ekstrak ditunjukkan oleh jumlah puncak (peak) pada kromatogram, sedangkan nama/jenis senyawa yang ada diinterpretasikan berdasarkan data spektra dari setiap puncak tersebut dengan menggunakan metode pendekatan pustaka pada database GC/MS (Hendayana, 1994).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining terhadap isolat bakteri simbion pada moluska jenis *Conus miles*, *Stramonita armigera*, *Cymbiola vespertilo* dari perairan pulau Bastiong Kepulauan Ternate, Maluku telah dilakukan. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri aktif yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan karena ketiga isolat mampu menghambat bakteri MDR lebih dari satu jenis yang meliputi *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *E.coli* dan *Enterobacter*. Hasil penelitian disimpulkan bahwa isolat TCM memiliki kekerabatan terdekat dengan *Pseudoalteromonas* sedangkan isolat TCA dan TOV memiliki kekerabatan yang dekat isolat yang sama-sama berada dalam genus *Vibrio*.

Dari 3 isolat yang paling aktif dan menjanjikan yang berasosiasi dengan moluska dalam penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut termasuk genus *Vibrio* dan *Pseudoalteromonas*. Anggota dari Alteromonadales dan Vibrionales dalam Proteobacteria dikenal sebagai produser dominan antibiotik (Long and Azam, 2001; Grossat *et al.*, 2004). Lebih lanjut Radjasa *et al.* (2007a), melaporkan aktivitas antibakteri dari bakteri *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB 4.2 yang berasosiasi dengan karang keras *Acropora* sp. aktif menghambat pertumbuhan bakteri karang dan pathogen. Bakteri *Pseudoalteromonas flavipulchra* BSP5.1 yang merupakan simbion sponge *Haliclona* sp. yang diperoleh dari perairan Bandengan, Jepara mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri pathogen *Alteromonas hydrophila* dan *Vibrio parahaemolyticus* (Radjasa *et al.*, 2007c). Penelitian lain (Radjasa *et al.*, 2007d), melaporkan aktivitas antibakteri dari 3 isolat bakteri

dari sponge *Aaptos* sp. termasuk *Pseudoalteromonas luteoviolacea* SPA21 yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri MDR *Escherichia coli* dan *Proteus* sp. Bakteri genus *Pseudoalteromonas* diketahui memiliki fragmen gen Non-ribosomal peptide syntease (NRPS) yang diketahui menghasilkan siderophore Alterobactin (Deng *et al.*, 1995).

Genus *Vibrio* diketahui sebagai sumber potensial antibiotika, Radjasa *et al* (2007c) menyatakan bahwa bakteri *Vibrio* BSP1.12 yang diisolasi dari sponge *Haliclona* sp. mampu menghambat pertumbuhan bakteri pathogen *Alteromonas hydrophila* yang merupakan causative agent pada penyakit Motile Aeromonas Septicemia (MAS) yang menyerang ikan mas. Bakteri *Vibrio* MJ.11 yang diisolasi dari karang lunak *Porites lutea* juga diketahui mampu menghambat bakteri pathogen *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus* sp. (Radjasa, tidak dipublikasikan).

Hasil skrining menunjukkan bahwa bakteri simbiosis moluska sangat potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri MDR. Hal ini menjadi poin penting karena selama ini masalah suplai bahan baku menjadi kendala dalam pengembangan senyawa bioaktif dari avertebrata laut (Proksch *et al.*, 2002), karena senyawa yang dihasilkan sangat terbatas sehingga dapat mengancam keberadaan avertebrata laut itu sendiri.

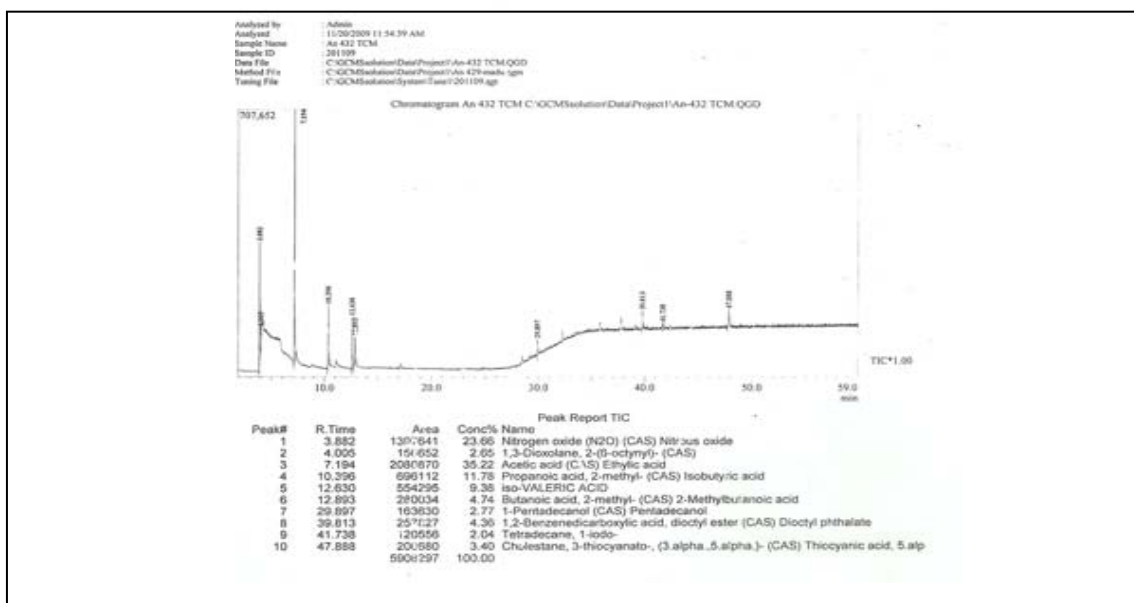
Hasil skrining terhadap isolat bakteri simbiosis pada moluska yang diambil dari wilayah Maluku Utara menunjukkan bahwa bakteri simbiosis moluska sangat potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri MDR. Hal ini menjadi poin penting karena selama ini masalah suplai bahan baku menjadi kendala dalam pengembangan senyawa bioaktif dari invertebrata laut (Proksch *et al.*, 2002), karena senyawa

yang dihasilkan sangat terbatas sehingga dapat mengancam keberadaan avertebrata laut itu sendiri. Jadi dalam konteks pemanfaatan sumber daya laut yang berkelanjutan hasil penelitian ini sangat menjanjikan untuk ditindak lanjuti lebih lanjut.

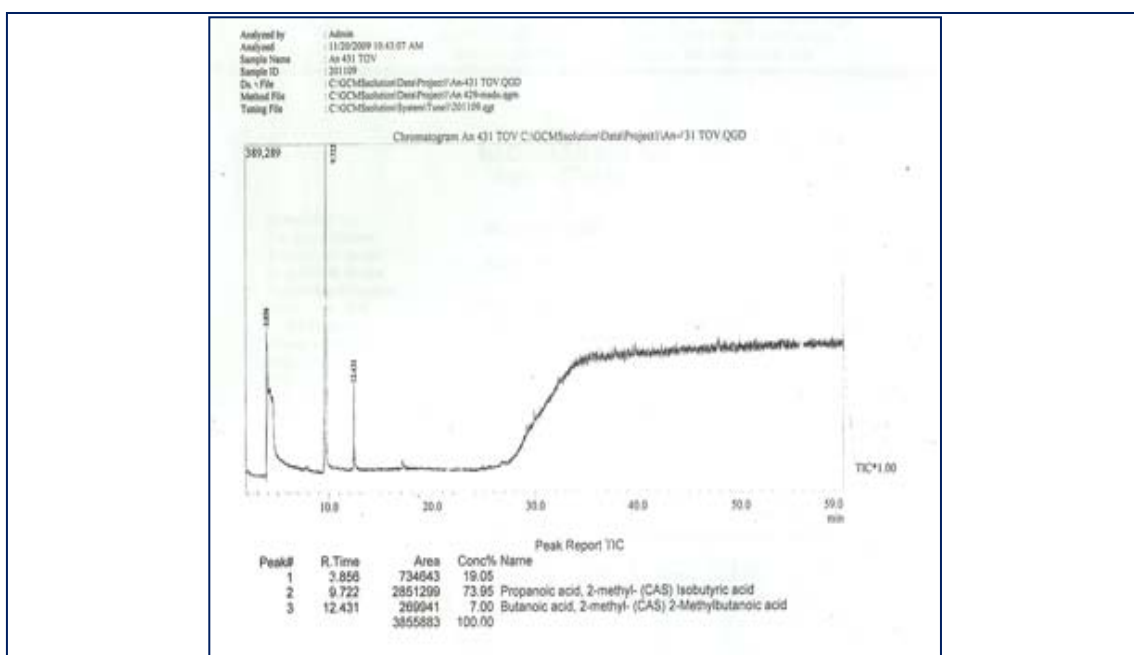
Analisis GC-MS dilakukan pada isolat aktif TCM6.1, TCA8.7 dan TOV12. sebagai fraksi yang memiliki aktivitas anti bakteri terbaik. Pendugaan senyawa dengan menggunakan Gas Chromatography menunjukkan terdapat beberapa senyawa yang terdeteksi dari fraksi TCM, yakni: Nitrogen oxide (N₂O) (CAS) Nitrous oxide; 1,3-Dioxolane, 2-(6-octynyl)-(CAS); Acetic acid (CAS) Ethylic acid; Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid; Iso-VALERIC ACID; Butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-Methylbutanoic acid; 1-Pentadecanol (CAS) Pentadecanol; 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester (CAS) Dioctyl phthalate; Tetradecane, 1-iodo-; Cholestane, 3-thiocyanato, (3.alpha.,5.alpha.)-(CAS) Thiocyanic acid, 5.alpha. Sedang fraksi TOV terdeteksi senyawa Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid; Butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-Methylbutanoic acid dan fraksi TSA terdeteksi senyawa: 1,2-Propadiene (CAS) Allene seperti yang tertera pada Gambar 1, 2 dan 3.

Hasil GC-MS pada sampel fraksi TCM memperlihatkan bahwa pada fraksi terdeteksi 10 puncak senyawa, tapi hanya 3 senyawa yang lebih dominan, yakni senyawa Nitrogen oxide (N₂O) (CAS) Nitrous oxide; Acetic acid (CAS) Ethylic acid; Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid dan fraksi isolat TOV terdeteksi senyawa Propanoic acid, 2-methyl-(CAS) Isobutyric acid; Butanoic acid, 2-methyl-(CAS) 2-Methylbutanoic acid sedang fraksi isolat TSA terdeteksi senyawa 1,2-Propadiene (CAS) Allene.

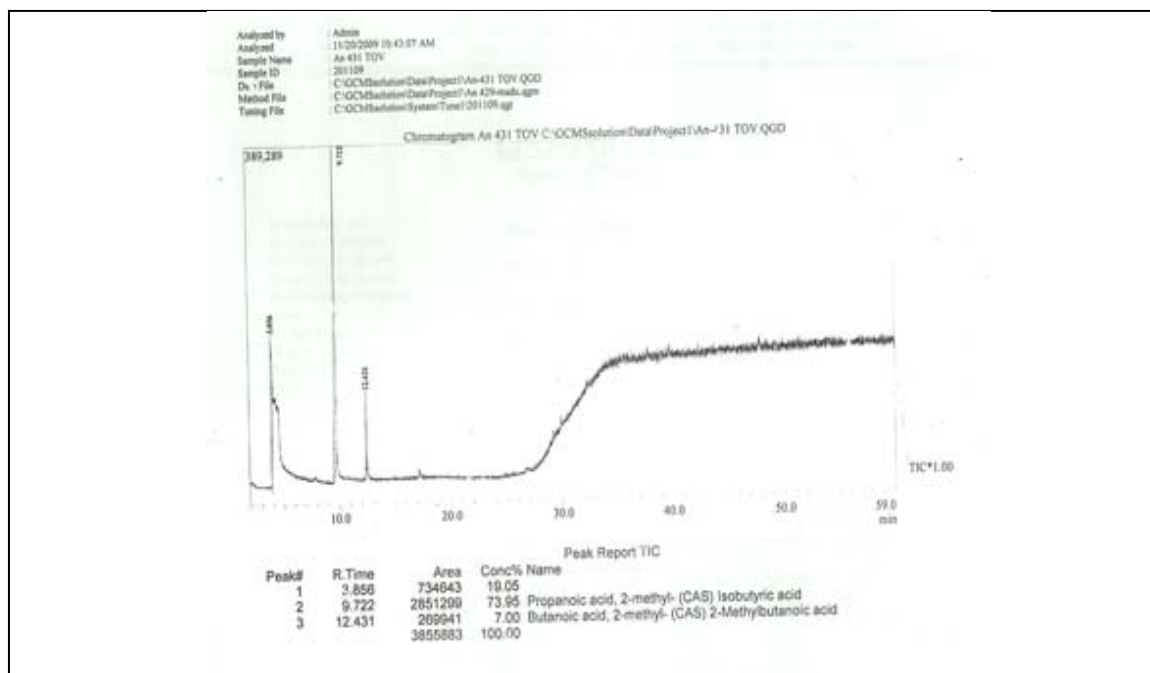
Karakteristik Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion...



Gambar 1. Kromatogram GC-MS TCM memperlihatkan bahwa senyawa yang dominan adalah Acetic acid (CAS) Ethylic acid



Gambar 2. Kromatogram GC-MS TOV memperlihatkan bahwa Propanoic acid,2-methyl-(CAS) Isobutyric acid



Gambar 3. Kromatogram GC-MS TSA memperlihatkan bahwa Propadiene (CAS) Allene

Senyawa acid memperlihatkan senyawa yang yang potensi sebagai anti bakteri dengan cara menghancurkan dinding sel dan menghambatan sintesis dinding sel (Mutchler, 1991). Diduga senyawa acid tersebutlah yang berperan memiliki kemampuan antibakteri (Kim *et al.*, 2004). Seperti yang dinyatakan oleh Hillenga *et al.* (1995), bahwa Asam Benzenasetat digunakan dalam pembuatan Penicilin G. Asam Benzen-asetat mempunyai kemampuan untuk menembus membran plasma pada sel.

Dapat diasumsikan bahwa mekanisme kerja dari TCM, TOV dan TSA dari bakteri simbiosis Moluska adalah melalui penghambatan sintesis dinding sel seperti mekanisme kerja penisilin melalui penghambatan sintesis dinding sel (Jawetz *et al.*, 2001). Ditambahkan pula oleh Katzung (2004), bahwa antibiotik beta-laktam melintasi membran luar dan memasuki organisme-organisme gram negatif melalui saluran protein membran luar. Jadi dalam konteks pemanfaatan sumber daya laut

yang berkelanjutan hasil penelitian ini sangat menjanjikan untuk ditindak lanjuti lebih lanjut.

IV. KESIMPULAN

Isolat bakteri aktif yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan karena ketiga isolat mampu menghambat bakteri MDR.

Hasil GC-MS pada sampel fraksi TCM memperlihatkan bahwa pada fraksi terdeteksi 10 puncak senyawa, senyawa yang lebih dominan yakni senyawa Acetic acid (CAS) Ethylic acid dan fraksi isolat TOV terdeteksi senyawa yang lebih dominan yakni Propanoic acid, 2-methyl- (CAS) sedang fraksi isolat TSA terdeteksi senyawa 1,2-Propadiene (CAS) Allene.

Isolat fraksi TCM berpotensi memberikan kontribusi sebagai sumber alternatif baru metabolit sekunder dari bahan farmasi bahari dalam menghasilkan produk sebagai desinfektan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional, Hibah Kompetensi 2010. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Ocky K Radjasa dan Dr. Adus Sabdono MSc Jur. Ilmu Kelautan FPIK UNDIP Semarang.

DAFTAR PUSTAKA

- Burgess J.G., K.G. Boyd, E. Armstrong, Z. Jiang, L. Yan, M. Berggren, U. May, T. Pisacane, A. Granmo, and D.R. Adams, 2003. Development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, 19:197-205
- Hunt, B., and A.C.J. Vincent. 2006. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *Ambio*, 35(2):57-64.
- Kim TK, MJ Garson., and J A Fuerst. 2005. Marine actinomycetes related to the Salinospora group from the Great Barrier Reef sponge *Pseudoceratina clavata*. *Environ. Microbiol.*, 7:509-518.
- Long R, and F. Azam, 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl Environ Microb.*, 67:4975-4983
- Pringgienies. D, O.K. Radjasa, dan A. Sabdono. 2008. Bioprospeksi Moluska dan Bakteri Simbionnya Dalam Rangka Penanganan Strain MDR (Multi Drug Resistant. Program Intensif Riset Dasar 2007/2008.. Lembaga Penelitian Universitas Diponegoro. November 2008. Laporan Penelitian. 40 Hal.
- Proksch, P., R.A. Edrada, and R. Ebel. 2002. Drugs from the sea-current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:125-134.
- Sukarmi dan O.K. Radjasa. 2007. Bioethical Consideration in the Search for Bioactive Compounds from Reef's Invertebrates. *J. Appl. Sci.*, 7(8):1235-1238
- Rajasa, O.K. 2003. Marine invertebrata-associated bacteria in coral reef ecosystems as a new source of bioactive compounds. *J. Coast. Dev.*, 7: 65-70
- Radjasa, O.K. and A.Sabdono. 2003. Screening of secondary metabolite-producing bacteria associated with corals using 16S rDNA-based approach. *J. Coast. Dev.*, 7:11-19.
- Radjasa, O.K., A. Sabdono, Junaidi, and E. Zocchi. 2007c. Richness of secondary metabolite-producing marine bacteria associated with sponge *Haliclona* sp. *Int. J. Pharmacol.*, 3(3):275-279.
- Radjasa, OK, H Urakawa, K Kita-Tsukamoto, and K Ohwada. 2001. Characterization of psychrotrophic bacteria in the surface and deep-sea waters from north-western Pacific Ocean based on 16S ribosomal DNA approach. *Mar. Biotechnol.*, 3:454-462.
- Hunt, B., and A.C.J. Vincent. 2006. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *Ambio*, 35(2):57-64.
- Olivera, B.M. 2000. Conotoxin MVIIA: From marine snail venom to analgesic drug. In: Fusetani (ed.) *Drugs from the sea*. Karger, 74-85pp.
- Watermann, B. 1999. Alternative antifoulant techniques present and future. *Limno. Mar.*, 1(6):6-7.